



## ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-TUMORAL DO POLISSACARÍDEO (PJU) EXTRAÍDO DE *Anacardium occidentale* FRENTE A UM MODELO EXPERIMENTAL DO SARCOMA 180

*Study of the antitumoral activity of a polysaccharide from Anacardium occidentale (PJU) using the sarcoma 180 experimental model*

Alexandra Patrícia de S. Florêncio<sup>1</sup>; José Humberto de Lima Melo<sup>1</sup>; Carlos Renato F. Carvalho Mota<sup>1</sup>; Mário Ribeiro de Melo-Júnior<sup>1,2</sup>; Rosângela Vidal de Souza Araújo<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup> Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES) – Faculdade do Agreste de Pernambuco (FAAPE)

<sup>2</sup> Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife (PE), Brazil

\* Autor para correspondência e-mail: rosangela.vidal@gmail.com

Recebido em 27/04/2007 - Aceito em 29/06/2007

**RESUMO:** Atualmente, os polissacarídeos são considerados moléculas farmacologicamente ativas, nos vários campos de aplicação, sendo clinicamente utilizados no tratamento de neoplasias em humanos; estes têm sido classificados como modificadores de resposta biológica. Este trabalho teve o objetivo de testar experimentalmente o polissacarídeo da goma do cajueiro roxo, *Anacardium occidentale* (PJU), frente à células tumorais de Sarcoma 180 (S-180). Para a manutenção da linhagem celular, as células S-180 foram inoculadas na região peritoneal de camundongos para o crescimento do tumor na forma ascítica. Para o crescimento do tumor sólido, as células tumorais na forma ascítica, foram inoculadas via subcutânea na região dos membros inferiores dos animais. Dois grupos (n=20) foram estudados, grupo PJU: camundongos que desenvolveram o tumor sólido e após 24 horas foram tratados com PJU (100 mg/Kg) diluído em salina, grupo NaCl: animais que desenvolveram o tumor sólido e foram tratados em dose única com solução salina (150 mM). Todos os animais foram diariamente monitorados por sete dias verificando-se o peso, estado de saúde geral e desenvolvimento dos tumores. No último dia do experimento (7º dia) foi coletado sangue da cauda dos animais para análise hematológica, a qual não evidenciou alterações expressivas nas células sanguíneas entre os grupos, com exceção de uma eosinofilia no grupo PJU. Os tumores foram retirados e pesados, sendo verificado que os animais tratados com o PJU exibiram tumores com peso médio reduzido (p<0,05) quando comparados ao grupo controle (NaCl). Os dados preliminares deste estudo indicam que o polissacarídeo extraído da goma do cajueiro *Anacardium occidentale* apresenta uma provável ação anti-tumoral *in vivo*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Polissacarídeo; *Anacardium occidentale*; Sarcoma 180.

**ABSTRACT:** Currently, the polysaccharides are considered pharmacologically active molecules, in the some fields of application, and clinically used in to human neoplasias treatment; these have been classified as biological response modulator. This work had the objective to test the polysaccharide from the gum of the *Anacardium occidentale* (PJU) in the tumoral cells of the Sarcoma 180 (S-180). For the maintenance of the cells, the S-180 cells had been inoculated in the peritoneal region of mice for the ascitic tumor growth form. For the solid tumor growth, the tumor cells had been inoculated in the subcutaneous way in the anterior legs of the animals. Two groups (n=20) had been studied, PJU group: mice that had developed the solid tumor after seven days ago and had been treated with PJU (100 mg/Kg) diluted in buffer saline; NaCl group: animals that developed the solid tumor and treated only one dose with saline solution (150 mM). All the animals daily had been monitored during seven days and were obtained the body weight, general health conditions and development of the tumors. In the last experimental day, the tail blood was collected to the hematological analysis, which did not evidence expressive alterations in the blood cells between the studied groups. However, the PJU group showed eosinophily. The tumors had been removed and weighed, the animals treated with PJU had significant decreased in the tumoral weight (p<0.05), when compared with the control group

(NaCl). The preliminary data of this study indicate that polysaccharide extracted from the *Anacardium occidentale* gum presents a probable anti-tumoral action *in vivo*.

**KEYWORDS:** polysaccharide; *Anacardium occidentale*; Sarcoma 180.

## INTRODUÇÃO

As neoplasias vêm sendo indicadas como a terceira causa *mortis* mais freqüente no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Assim, as doenças cardiovasculares, o câncer e as causas externas são, conjuntamente, responsáveis por 75% dos óbitos (INCA, 2006). Portanto, continuam em expansão as linhas de pesquisas para novos compostos anti-neoplásicos e sua avaliação em vários sistemas tumorais e cultura de tecidos, objetivando selecionar compostos mais efetivos (HUSSAR, 2000a, b; ASLANI, et al., 2000).

Para aperfeiçoar a reabilitação de lesões, inclusive lesões tumorais, podem-se utilizar biomateriais, compreendidos como materiais interativos capazes de estabelecer uma afinidade apropriada com tecido vizinho sem indução de uma resposta adversa do hospedeiro (RATNER & BRYANT, 2004). Os polissacarídeos estimulam o sistema imune *in vivo* e *in vitro* e contribuem favoravelmente no processo anti-neoplásico podendo ser utilizado como biomateriais (DIALLO, et al., 2001; KWEON, et al., 2003; SENEL & MCCLUER, 2004). O heteropolissacarídeo proveniente da goma do *Anacardium Occidentale* L. (P JU), é um exemplo de polissacarídeo que vem sendo utilizado em diversas pesquisas e tem apresentado resultados terapêuticos satisfatórios (SCHIRATO, et al., 2003).

Atualmente, os polissacarídeos são considerados moléculas farmacologicamente ativas, principalmente com atividade anticoagulante, anti-viral e anti-tumoral (HASLLIN, et al., 2001). Farmacologicamente, eles são classificados como modificadores de resposta biológica (MRB) (BOHN & BEMILLER, 1995). Alguns polissacarídeos, como o imunoglucan<sup>®</sup>, que é uma  $\beta$  1,3 glicopiranose, encontram-se no mercado farmacêutico como uma opção para o tratamento do câncer de estômago e mama. Dentre os mecanismos de ação deste polissacarídeo destacam-se a otimização da atividade quimiotática, potencialização dos fenômenos de opsonização, garantindo uma maior atividade fagocitária e citotóxica (HEBRON, 2005).

O PJU proveniente de *A. occidentale* vem sendo utilizado em algumas pesquisas e tem apresentado resultados terapêuticos satisfatórios, potencializando o processo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos (SCHIRATO, et al., 2006), atividade antimicrobiana (ANKINPELU, 2001), bem como atividade anti-tumoral *in vitro* frente a células HeLa (BARROS, et al., 2004).

Quanto à escolha do modelo biológico de neoplasias, ressalta-se a importância epidemiológica desta doença, responsável por grande parte dos óbitos no mundo e no Brasil. E, apesar dos sucessos em muitos casos, ainda não foi encontrado um tratamento que fosse simultaneamente eficaz e de baixa toxicidade. Este tipo de tratamento pode ser encontrado com uma molécula natural, como é o caso do imunoglucan<sup>®</sup>.

A partir desses dados, o presente estudo testou *in vivo* a possível atividade anti-tumoral do PJU frente a camundongos transfectados com o sarcoma 180.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais e tumor experimental

Camundongos (*Mus musculus*), Swiss, machos (n=20), com idade entre 45-60 dias e peso médio de 35 gramas, foram mantidos no Biotério da Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES).

As células tumorais do Sarcoma 180 foram provenientes do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e mantidos no biotério da ASCES, através de passagens intraperitoneais (i.p.) semanais em camundongos. O líquido ascítico com células tumorais do sarcoma 180 germinadas por 7 dias, foi aspirado e centrifugado (70g, 5 min, 4°C). Através do sedimento realizou-se a contagem celular e teste de viabilidade celular com Azul de Tripán. A concentração de células viáveis foi ajustada com solução de NaCl 150 mM estéril para  $5,0 \times 10^7$  células.ml<sup>-1</sup>. O volume de 0,1 ml foi inoculado via subcutânea (s.c.) na região dorsal direita de cada camundongo, para que ocorresse o crescimento na forma sólida do tumor.

A forma sólida do tumor foi desenvolvida em camundongos durante 7 dias, até a formação de massa tumoral palpável que comprometia a mobilidade dos membros inferiores do animal. Após este período, foi coletado o sangue, via caudal, para análise hematológica; também foram retirados e pesados todos os tumores, com cada animal sendo previamente eutanasiado pelo método de deslocamento cervical e com os mesmos previamente anestesiados com a associação de cloridrato de xilazina e cloridrato de cetamina nas dosagens de 10 mg/kg e 115 mg/kg, respectivamente, por via subcutânea.

O protocolo experimental deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa animal da ASCES.

### Substância-teste

O polissacarídeo PJU foi extraído e purificado a partir da goma do cajueiro *Anacardium occidentale*, no Setor de Bioquímica do LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami), órgão suplementar da Universidade Federal de Pernambuco, utilizando-se a metodologia descrita por MENESTRINA, et al. (1998).

### Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente organizados em dois grupos experimentais: grupo PJU: camundongos que desenvolveram o tumor sólido por 7 dias e no 8º dia foram tratados em dose única com PJU (100 mg/Kg) diluído em salina, e grupo NaCl: animais que desenvolveram o tumor sólido e foram tratados com solução salina (150 mM), durante o mesmo período de tempo do grupo PJU.

### Estudo hematológico

Foram coletados cerca de 1ml de sangue da cauda dos animais previamente anestesiados, onde foram confeccionados estiracões sangüíneos em lâminas histológicas previamente sinalizadas. Após a secagem as lâminas foram imersas em corante panótico rápido para realização das contagens dos leucócitos.

### Análise dos dados

Os dados referentes ao peso médio dos tumores e porcentagem dos leucócitos foram submetidos à análise estatística, através do software PRISMA 3.0, pelo teste t pareado e teste de Tukey, respectivamente. Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $M \pm DP$ ), aceitando-se como estatisticamente importantes os valores comparados ao nível de significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma nova abordagem no tratamento de várias patologias, especialmente neoplasias e doenças parasitárias, tem sido a utilização de modificadores da resposta biológica, ou seja, drogas que promovem a modulação da resposta imune dos pacientes (HAN, et al., 1999).

Tem sido estabelecido que vários polissacarídeos apresentam a capacidade de estimular o sistema imune podendo ser classificados como MRB. Têm sido amplamente qualificados no que diz respeito às neoplasias *in vivo* e *in vitro* (WHISTLER, et al., 1976; BOHN & BEMILLER, 1995; CARNEIRO-LEÃO, et al., 1997; FALCH, et al., 2000; KIDD, 2000; STUELP-CAMPELO, et al., 2002).

Os polissacarídeos com maior atividade anti-tumoral são (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucanas com ramificações de grupos (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucosil (MIZUNO, et al., 1998), com alta massa molecular (> 90000 Da) e estruturas ordenadas, como hélices triplas ou simples. Esta estrutura secundária seria estabilizada pelas ramificações simples, nos percentuais entre 20 e 33% (BOHN & BEMILLER, 1995).

O heteropolissacarídeo ramificado extraído da goma de *Anacardium occidentale* (PJU) é formado por galactose (61%), arabinose (14%), ramnose (7%), glicose (8%), ácido glicurônico (5%), além de pequenas quantidades (aproximadamente 2% de cada) de manose, xilose e ácido metilglicurônico (PAULA & RODRIGUES, 1995).

Este polissacarídeo, com massa molecular de  $1,1 \times 10^5$  Da, apresenta uma cadeia principal formada por unidades de D-Galp unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), substituídos em O-6. Foi relatada a presença de quatro substituintes distintos:  $\beta$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)-;  $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Galp;  $\alpha$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Galp; e  $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpA (MENESTRINA, et al., 1998).

Neste estudo, a análise hematológica dos animais que receberam o tratamento e aqueles não-tratados não evidenciou alterações expressivas tanto na morfologia ou número nas células sanguíneas entre os grupos estudados, com exceção do número de eosinófilos que aumentou no grupo exposto ao PJU (Tab. 1).

**Tabela 1.** Perfil hematológico dos animais com tumor experimental Sarcoma 180 tratados com polissacarídeo extraído da goma de *A. occidentale* (PJU - 100.mg/kg).

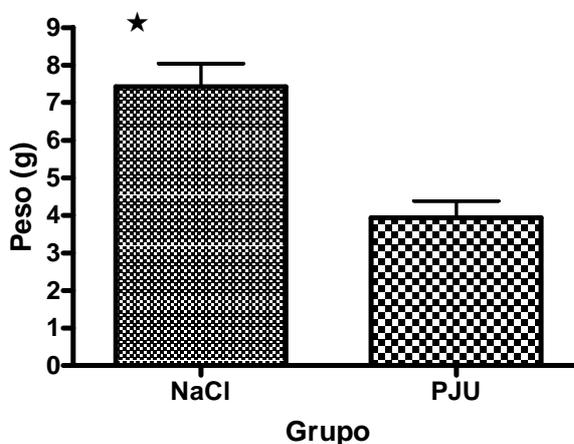
	<b>CÉLULAS</b>	<b>NACL 150 mM (%)</b>	<b>PJU (%)</b>
A	Segmentados	69,3	72,0
	Bastonetes	4,0	0,0
	Linfócitos	20,3	21,55
	Eosinófilos	1,0	15,0
	Monócitos	8,3	6,3

investigação hematológica justifica-se neste tipo de protocolo experimental devido a dados recentes da literatura que apontam que os efeitos adversos mais comuns durante os tratamentos químicos de neoplasias são: alterações gastrintestinais e alterações hematológicas (KUBO, et al., 1993).

As células pluripotentes da medula óssea são de renovação rápida, portanto muito susceptíveis à ação dos agentes quimioterápicos, podendo então, ocorrer leucopenia, granulocitopenia, trombocitopenia e anemia (ROQUE, et al., 2006), sinais que não foram demonstrados nos grupos tratados com o PJU.

No sétimo dia da evolução tumoral os tumores sólidos foram retirados e pesados, sendo verificado uma redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) de 46,6% no peso médio tumoral dos animais tratados com o PJU quando comparados ao grupo controle (NaCl) (Figura 1).

Trabalhos recentes demonstram que o extrato aquoso de plantas tem comprovado efeito citotóxico e anti-tumoral *in vitro* sobre células de melanoma (JIMÉNEZ-MEDINA, et al., 2006). E mais especificamente, a partir de polissacarídeos isolados de plantas, observou-se uma rejeição aos tumores experimentais implantados em ratos, que indicam também uma possível atividade imunomoduladora destas substâncias (GIL, et al., 2005; PAGNO, et al., 2006).

**Figura 1.** Peso médio de tumores retirados de animais tratados com o polissacarídeo extraído da goma de *A. occidentale* (PJU – 100 mg/kg). \*  $p \leq 0,05$ 

Neste contexto, se faz necessários estudos mais detalhados, como análises *in vitro*, da possível atividade citotóxica, bem como a investigação de possíveis mecanismos imunomoduladores do PJU.

Levando-se em consideração os resultados da avaliação da atividade tumoral com polissacarídeos e seu papel na potencialização do sistema imune, justifica-se a utilização de novos polissacarídeos que possam esclarecer os mecanismos de ação destas substâncias. Neste trabalho, porém, ressalta-se que o polissacarídeo estudado é obtido da flora nordestina, e o acesso ao PJU é favorecido pelo amplo cultivo do cajueiro no Nordeste (400.000-450.000 ha), considerando-se que cada árvore produz 178 a 2000 g/ano da goma, com um valor médio de 700g/ano. Além do mais, trata-se de um recurso natural renovável, que pode ser explorado sem agressões ambientais.

## CONCLUSÕES

A partir dos dados preliminares obtidos pode-se concluir que se faz necessária à continuidade das investigações com o polissacarídeo extraído da goma do cajueiro *Anacardium occidentale*, visto que o PJU demonstrou ser uma substância com atividade anti-tumoral contra as células do Sarcoma 180.

## AGRADECIMENTOS

A incessante colaboração dos acadêmicos de Biomedicina Ana Thereza, Conrado Bastos Batista, José David da Costa Bittencourt e Laíse Paula Gonçalves Dornelas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PROCÓPIO, A. E. A.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, LOPES, J. V.; LIMA-FILHO, J. L.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; CARNEIRO LEÃO, A. M. A. in Anais da 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambú, 2000.

CARNEIRO LEÃO, A. M. A.; et al. Cytotoxic effect against HeLa cells of polysaccharides from the lichen *Ramalina celastri*. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*. v. 29, p. 503-509, 1997

ASLANI, A.; et al. The predictive value of body protein for chemotherapy-induced toxicity. *Cancer*. v. 88, p. 796-803, 2000.

BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1→3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr. Polym.* v. 28, p. 3-14, 1995.

HUSSAR, D. A. *New drugs 2000*. Part I. Nursing. v. 30, p. 55-62, 2000a.

HUSSAR, D. A. *New drugs 2000*. Part II. Nursing. v. 30, p. 55-62, 2000b.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde, 2006. Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil [on line]. <http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa2006/neoplasia.html> [Capturado em 28 junho de 2007].

MENESTRITA, J. M.; et al. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. *Phytochemistry*. v. 47, p. 715-721, 1998.

MIZUNO, M.; et al. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. v. 62, p. 434-437, 1998.

KIDD, P. M. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Alternative Medicine Review*. v. 5, p. 4-27, 2000.

STUELP-CAMPELO, P. M.; et al. Effect of a soluble α-D-glucan from lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. *International Immunopharmacology*. v. 2, p. 691-698, 2002.

PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew trees gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. *Carbohydr. Polym.* v. 26, p. 177-181, 1995.

Whistler R. L.; et al. Noncytotoxic, antitumor polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. v. 32, p. 235-275, 1976.

ROQUE, V. M. N.; FORONES, N. M. Evaluation of the toxicity and quality of life in patients with colorectal cancer treated with chemotherapy. *Arq. Gastroenterol.* v. 43, n. 2, 2006.

SENEL, S.; McCCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 56, p. 1467-1480, 2004.